Revue suisse Zool.	Tome 89	Fasc. 4	p. 837-844	Genève, décembre 1982

Über die Letalität und Hybridogenese beim *Rana esculenta*-Komplex [1]

von

J. BINKERT, P. BORNER und P. S. CHEN *

Mit 4 Tabellen und 2 Abbildungen

ABSTRACT

Concerning the lethality and hybridogenesis in *Rana esculenta* **complex.** — Numerous studies of the European green frogs have demonstrated that *Rana ridibunda* and *Rana lessonae* are two distinct species, whereas *Rana esculenta* represents their hybrid (see references in BERGER 1982). In order to understand the complex phenomena of lethality and hybridogenesis in *R. esculenta* further crossing experiments between these three green frog phenotypes have been carried out by us. In agreement with previous results the *inter se* cross of *R. esculenta* is usually lethal, but in several cases it has yielded viable progeny. The frequency of such viable break-throughs appears to be related to the population structure of the parental frogs. Studies of the parabiotic pairs between a lethal and a viable embryo indicate that the lethality is autonomous excepting a 16-18% increase in the life span of the lethal partner. Thyroxine treatment revealed that the metamorphic capacity of the break-through larvae is distinctly reduced compared with that of the controls. Two-dimensional separation of the LDH isozymes by both polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectrofocusing showed that the *lessonae*-specific genes coding for the B^a and B^c subunits can be passed from a parental *esculenta* female or male to the F_1 progeny. Analysis of the patterns of immunologically active proteins also demonstrated the possible chromosomal recombination between *R. lessonae* and *R. ridibunda.* All these results suggest that there is not always a total elimination of the *lessonae* genome during hybridogenesis of the *R. esculenta* complex (see also TUNNER & HEPPICH 1981).

[1] Ausgeführt mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und der Georges und Antoine Claraz-Schenkung.
Vortrag gehalten an der Jahresversammlung der SZG in Neuenburg, 12.—13. März 1982.

* Zoologisches Institut der Universität, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich (Schweiz).

EINLEITUNG

Zahlreiche Untersuchungen über die mitteleuropäischen Grünfrösche haben klar gezeigt, dass *Rana lessonae* (les) und *Rana ridibunda* (rid) zwei eigene Arten sind, während *Rana esculenta* (esc) deren Bastard darstellt (für Literatur siehe Vogel 1977, Binkert 1981, Berger 1982). Unsere früheren Untersuchungsergebnisse über die genetische Kontrolle der LDH-Isozyme bei diesen drei Froschtypen stimmen mit der erwähnten Schlussfolgerung überein (Vogel & Chen 1976, 1977). Das Problem der Hybridogenese ist jedoch bei weitem nicht so einfach, da die *inter se*-Kreuzungen von *R. esculenta* häufig reduzierte Fertilität und hohe Letalität aufweisen. Um dieses komplexe Phänomen zu verstehen, haben wir weitere Hybridisierungsexperimente durchgeführt, und die F_1-Nachkommen der verschiedenen Kreuzungen mittels entwicklungsphysiologischen und immunologischen Methoden untersucht. Dabei wurden die letalen Individuen aus der Kreuzung *esculenta* × *esculenta* besonders eingehend analysiert.

MATERIAL UND METHODEN

Adulte Frösche der Phänotypen *R. lessonae* und *R. esculenta* wurden jeweils im Mai aus vier verschiedenen Weihern in der Umgebung von Zürich gesammelt und in Aquarien gehalten. Die Frösche des Phänotyps *Rana ridibunda* stammten aus dem Balkan. Neben natürlicher Paarung wurde künstliche Besamung durchgeführt. Für die Identifikation des Phänotyps der Elterntiere wurde neben morphologischen Kriterien das Serumalbuminmuster elektrophoretisch bestimmt. Das Serumalbumin bei *R. esculenta* erscheint als eine Doppelbande, während die anderen zwei Phänotypen je eine einfache Albuminbande mit unterschiedlicher Mobilität besitzen (Vogel 1973). Im allgemeinen wurden die Embryonen und Larven bei Zimmertemperatur (20-22° C) aufgezogen und ab Shumway-Stadium 25 (Shumway 1940) mit Brennesselpulver und Luzernemehl (1:1) gefüttert. Für die Parabiose- und Thyroxinversuche (siehe unten) betrug die Zuchttemperatur 18° C.

Um die genetisch bedingte Letalität der *inter se*-Kreuzung von *R. esculenta* näher zu analysieren, wurden Embryonen aus einer solchen Kreuzung je mit einem vitalen Embryo in Parabiose gebracht. Das Verwachsen beider Partner geschah durch operative Entfernung eines Rumpfektodermstücks im Schwanzknospenstadium. Ferner wurde die Reaktionsfähigkeit der letalen Larven durch Behandlung mit Thyroxin in Konzentrationen von 1:50, 100 und 200 Millionen geprüft. Dabei dienten vor allem das Wachstum und die Entwicklung der Extremitäten als Kriterien der Hormonwirkung.

Die Isozyme der Lactatdehydrogenase (LDH) wurden einerseits mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) nach Davis (1964) und andererseits durch isoelektrische Fokussierung (pH 3—10) nach den Angaben der Firma Pharmacia aufgetrennt.

Für die immunologischen Untersuchungen wurden Antikörper gegen Gesamtserumproteine von *R. lessonae* und *R. ridibunda* hergestellt. Die unterschiedlichen Muster der antigenisch aktiven Proteine wurden mit Hilfe der 2-dimensionalen Immunoelektrophorese nach Crowle (1973) ermittelt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Die Letalität und Entwicklung der *inter se*-Kreuzung von *R. esculenta.*

Die Fangstatistik der adulten Frösche in den Jahren 1978-1980 ist in Tabelle 1 zusammengestellt. Aus der geologischen Beschaffenheit des umgebenden Geländes geht hervor, dass die Biotope A, B und C wesentlich später entstanden sind als der Waldweiher D. Es ist interessant zu sehen, wie die Froschpopulationen zwischen Biotrop C und D auffallend verschieden sind. Das Verhältnis von *R. esculenta* zu *R. lessonae* beträgt 98:21 in C, und 47:91 in D. Alte Populationen sind offenbar ausgeglichener sowohl in bezug auf die Phänotypverteilung als auch in bezug auf das Geschlechtsverhältnis innerhalb eines Phänotyps. Ausserdem kamen *inter se*-Kreuzungen von *R. esculenta*, die vitale Nachkommen (Durchbrenner) lieferten, nur bei Elterntieren aus den Biotopen A und C vor. Es wurden aus A nur eine, aus C jedoch drei solche Kreuzungen beobachtet. In seinen Untersuchungen über die Viabilität der F_1-Generation von 51 *R. esculenta* Paaren fand BERGER (1971) Kreuzungen, in welchen alle Kaulquappen das Shumwaystadium 25 nicht erreichten bis zu solchen, in denen sich die Mehrzahl der Larven über die Metamorphose hinaus entwickelte. In unseren Versuchen waren hingegen alle Individuen innerhalb einer Kreuzung entweder letal oder vital. Es scheint,

TABELLE 1.

Fangstatistik der Jahre 1978, 1979 und 1980

Biotop	A		B		C		D		Phänotyp
Jahr	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
1978	—	—	—	—	33	4	6	4	*R. esculenta*
1979	18	17	4	4	27	5	8	7	
1980	5	5	1	5	12	17	16	6	
Total	23	22	5	8	72	26	30	17	
1978	—	—	—	—	6	6	9	10	*R. lessonae*
1979	2	1	6	3	3	3	18	25	
1980	—	—	—	4	—	3	11	18	
Total	2	1	6	7	9	12	38	53	

Tabelle 2.

Durchschnitliche Lebensdauer der Parabiosenlarven und einzeln gehaltenen Kontrollen der inter se-Kreuzung R. esculenta x R. esculenta

Klasse	Serie	Parabiose-Kombination	Lebensdauer der letalen Larven (Tage)	
			In Parabiose	einzeln
I	A	$ExE_c + ExE_B$	23	42
	B	$ExE_C + ExE_B$	31	42
	H	$ExE_C + ExE_{A1}$	45	36
II	D	$ExE_C + ExL_{D1}$	33	40
	E	$ExE_{A1} + ExL_{D1}$	44	32
	N	$ExE_D + ExL_{D2}$	37	24
	P	$ExE_{A3} + ExL_{D2}$	37	28
III	F	$ExE_C + LxL_{D1}$	42	40
	G	$ExE_{A1} + LxL_{D1}$	38	32
	O	$ExE_D + LxL_{D2}$	38	24

dass die Viabilität der F_1-Generation bei der esc × esc Kreuzung von der Populationsstruktur der Elterntiere abhängig ist.

Für die Parabioseversuche wurden im Prinzip Embryonen aus der letalen Kreuzung esc × esc (E × E) mit einem Embryo einer anderen Letalkreuzung (Klasse I) oder mit einem vitalen Partner der heterozygoten Kreuzung esc × les (E × L, Klasse II) oder der homozygoten Kreuzung les × les (L × L, Klasse III) kombiniert (Tab. 2). Jede Klasse wurde wiederum je nach dem Biotop der Elterntiere in verschiedene Serien eingeteilt. Die Analyse von insgesamt 156 Parabiosepaaren zeigt, dass die Entwicklung des letalen Embryos nicht durch den vitalen Partner beeinflusst wird. Die Letalität manifestiert sich autonom. Andererseits überleben mit einer Ausnahme (Serie D) alle Parabiosen zwischen vitalen und letalen Partnern die mittlere Lebensdauer der jeweiligen letalen, einzeln gehaltenen Kontrollen (Serien E, N, P, F, G, O) um 16—18% (siehe Tab. 2).

Wie Tabelle 3 zeigt, reagieren die Kaulquappen der Durchbrennerkreuzung viel langsamer auf die Thyroxinwirkung als die vitalen Kontrollen. Während bei den Kontrollen nach 60 Tagen in der Konzentration 1:100 Millionen bereits der Durchbruch

Tabelle 3.

Anzeichen der Thyroxinbeschleunigten Metamorphose zweier Kreuzungen gemessen an der Länge der Hinterextremität und dem Durchbruch der Vorderextremität

Kreuzung	Merkmal	Thyroxin-konzentration	Tage ab Laichdatum		
			50	55	60
vitale Kontrollen	Länge der Hinterextremität in mm	1: ∞	1	5	10
		1: 200 Mio	3	10	15
		1: 100 Mio	5	14	18
		1: 50 Mio	9	16	18
	Durchbruch der Vorderextremität	1: ∞	—	—	—
		1: 200 Mio	—	—	—
		1: 100 Mio	—	—	+
		1: 50 Mio	—	+	+
Durchbrenner	Länge der Hinterextremität in mm	1: ∞	—	—	—
		1: 200 Mio	1	3	5
		1: 100 Mio	1	4	5
		1: 50 Mio	1	3,5	6
	Durchbruch der Vorderextremität	1: ∞	—	—	—
		1: 200 Mio	—	—	—
		1: 100 Mio	—	—	—
		1: 50 Mio	—	—	+

der Vorderextremitäten erfolgt, wird bei Durchbrennern zu demselben Zeitpunkt die Metamorphose erst eingeleitet, was sich durch das Wachstum der Hinterextremitäten äussert. Der Durchbruch der Vorderextremitäten bei Durchbrennerlarven erfolgt erst durch die Behandlung mit einer unphysiologischen Konzentration von 1:50 Millionen.

Aus den Ergebnissen der Parabiose- und Thyroxinversuche ist klar, dass Durchbrennerkreuzungen von esc × esc nicht als voll vitale Kreuzungen von esc × les und les × rid betrachtet werden können.

2. Die B-Untereinheiten der LDH-Isozyme in der F_1 Generation

Die LDH-Isozyme wurden mittels PAGE und IEF untersucht. Mit Hilfe der 2-dimensionalen Elektrophorese können die LDH-Banden aus IEF ohne weiteres denjenigen der PAGE zugeordnet werden (Abb. 1). Die Ergebnisse stimmen mit unseren früheren Befunden überein, wonach die Allele, die die Untereinheiten B^a und B^c codieren, nur

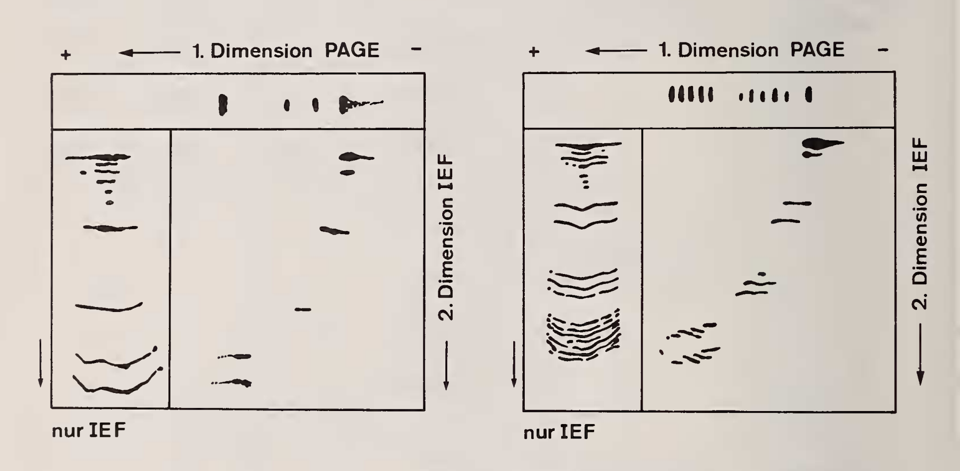


Abb. 1.

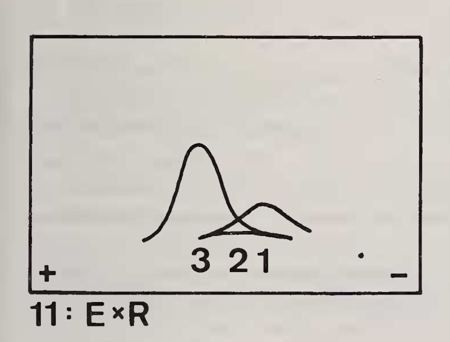
Zuordnung der LDH-Banden von PAGE zu IEF anhand 2-dimensionaler Elektrophorese. Links, esc, Genotyp B^b/B^b; rechts, esc, Genotyp B^d/B^b.

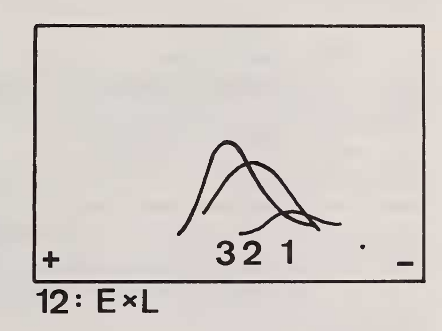
in *R. lessonae* vorkommen, während solche, die die Untereinheiten B^b und B^d codieren, nur in *R. ridibunda* nachweisbar sind. Hingegen besitzt *R. esculenta* alle vier Allele. Nach Tunner (1973) und Vogel (1977) werden die *lessonae*-spezifischen Allele für die Untereinheiten B^a und B^c nicht von Elterntieren des *R. esculenta* Phänotyps an die Nachkommen weitergegeben. Diese Schlussfolgerung wird unterstützt durch Graf & Müller (1979), welche in gynogenetisch erzeugten Kaulquappen die *lessonae*-typischen Isozyme nie feststellen konnten. Im Gegensatz fanden wir bei zwei esc × esc Kreuzungen die *lessonae*-spezifische Untereinheit B^c in der F_1-Generation (Tab. 4). In zwei weiteren Kreuzungen (esc × rid, esc × les) muss die Untereinheit B^a ebenfalls aus dem *esculenta*-Weibchen stammen. Dies beweist, dass die *lessonae*-Chromosomen bei der Hybridogenese nicht immer total eliminiert werden (see Tunner & Heppich 1981). Nach Uzzell *et al.* (1975) kommen bei *R. esculenta* oft diploide Gameten vor, die zur Bildung von triploiden Individuen führen können. Aufgrund unserer Messungen der Erythrocytendurchmesser kann angenommen werden, dass keine triploiden Tiere in den vorliegenden Untersuchungen verwendet wurden (siehe Binkert 1981).

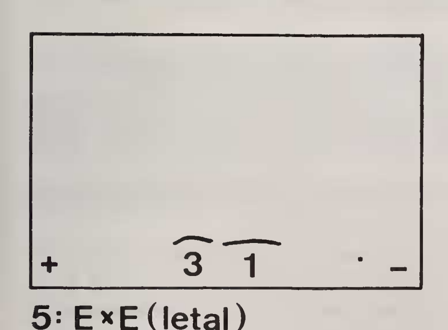
TABELLE 4.

Zusammenstellung der Kreuzungen, bei denen die lessonae-spezifischen Gene der B-Untereinheiten von Elterntieren des Phänotyps R. esculenta an die F_1-Generation weitergegeben werden

Weibchen		Männchen		F_1 Generation
Phänotyp	Genotyp	Phänotyp	Genotyp	
esc	B^a/B^d	esc	B^b/B^c	B^d/B^c
esc	B^a/B^d	esc	B^c/B^d	B^d/B^c
esc	B^a/B^b	rid	B^d/B^d	B^a/B^d
esc	B^a/B^b	les	B^c/B^c	B^a/B^c







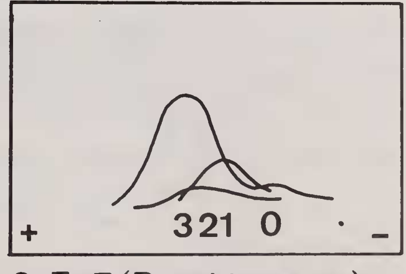


ABB. 2.

Zwei-dimensionale Immunoelektrophorese von Totalhomogenaten der Kaulquappen aus vier verschiedenen Kreuzungen. Es wurden Antiseren gegen *ridibunda* gebraucht.

3. Immunologische Verwandtschaftsbeziehungen der drei Phänotypen

Die 2-dimensionale elektrophoretische Auftrennung der immunologisch aktiven Proteine, die mittels Antisera gegen *ridibunda* ermittelt wurden, ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Die letalen Larven der Kreuzung 5 (E × E) waren sehr klein und ergaben deshalb nur zwei schwache präzipitierenden Fraktionen. Die Nachkommen der Kreuzung 6 (E × E), die ebenfalls eine *esculenta inter se*-Kreuzung war, erwiesen sich als vitale Durchbrenner. Es konnten vier Fraktionen festgestellt werden. Das Proteinmuster der vorliegenden Kreuzung zeigt eine wesentlich grössere Ähnlichkeit mit dem Muster der Kreuzung 11 (E × R) als mit demjenigen der Kreuzung 12 (E × L), was für die Elimination des *lessonae*-Genoms bei der Hybridogenese spricht. Mit anderen Worten stehen die Letalkreuzungen des Typs esc × esc immunologisch dem Phänotyp *ridibunda* näher als dem Phänotyp *esculenta*. Gleichzeitig ist aber zu bemerken, dass zwischen Kreuzung 6 und 11 keine Identität besteht. Daraus kann abgeleitet werden, dass nicht der ganze *ridibunda* Chromosomensatz vererbt wird, sondern dass eine Rekombination von *lessonae*- und *ridibunda*-Chromosomen möglich ist.

LITERATUR

Berger, L. 1971. Sex ratio in the F_1 progeny within forms of *Rana esculenta* complex. *Gen. Pol.* 12: 87-101.

— 1982. Recent progress in the study of the western palearctic water frogs (Amphibia, Ranidae). *Experientia* (Im Druck).

Binkert, J. 1981. Untersuchungen über die Letalität der *inter-se* Kreuzung von *Rana esculenta. Diss. Univ. Zürich.*

Crowle, A. J. 1973. Immunodiffusion. *Academic Press, New York.*

Davis, J. B. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.

Graf, J. D. and W. P. Müller. 1979. Experimental gynogenesis provides evidence of hybridogenetic reproduction in the *Rana esculenta* complex. *Experientia* 35: 1574-1576.

Shumway, W. 1940. Stages in the normal development of *Rana pipiens. Anat. Rec.* 78: 139-147.

Tunner, H. G. 1973. Das Albumin und andere Bluteiweisse bei *Rana ridibunda* Pallas, *Rana lessonae* Camerano, *Rana esculenta* Linné und deren Hybriden. *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.* 11: 219-233.

Tunner, H. G. and S. Heppich. 1981. Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta. Naturwissenschaften* 68: 207-208.

Uzzell, T., Berger, L. and R. Günther. 1975. Diploid and triploid progeny from a diploid female of *Rana esculenta* (Amphibia, Salientia). *Proc. Acad. Sci. nat. Philad.* 127, 81-89.

Vogel, P. 1973. Elektrophoretische Untersuchungen der Serumproteine von Grünfröschen aus dem *Rana esculenta-Komplex. Diplomarbeit Univ. Zürich.*

— 1977. Isozyme der Lactatdehydrogenase (LDH) im *Rana esculenta*-Komplex. *Diss. Univ. Zürich.*

Vogel, P. and P. S. Chen. 1976. Genetic control of LDH isozymes in the *Rana esculenta* complex. *Experientia* 32: 304-307.

— 1977. A further study of LDH isozymes in the *Rana esculenta* complex. *Experientia* 33: 1285-1287.